

Πρόγραμμα Θαλής-«Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας»

1

**Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας**

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

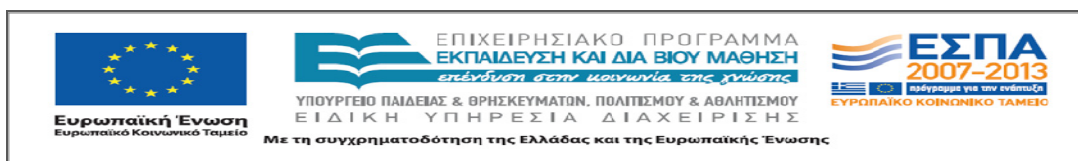
*Εργαστήριο Ζωοτεχνίας*

MIS 380231

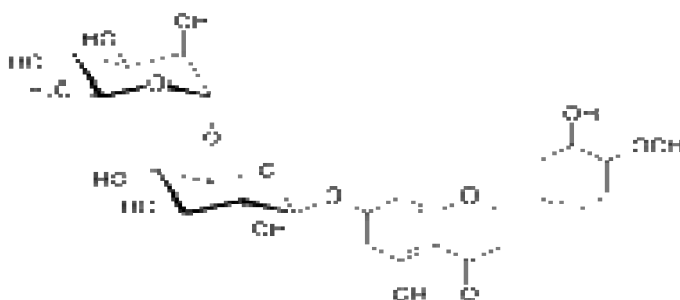
**Δράση 1<sup>η</sup> : Μεθοδολογία ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων**

**Παραδοτέο: D1\_P3b**

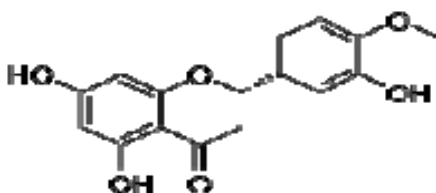
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗΣ,  
ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟ ΟΡΝΙΘΙΩΝ (ΚΡΕΑΣ)**



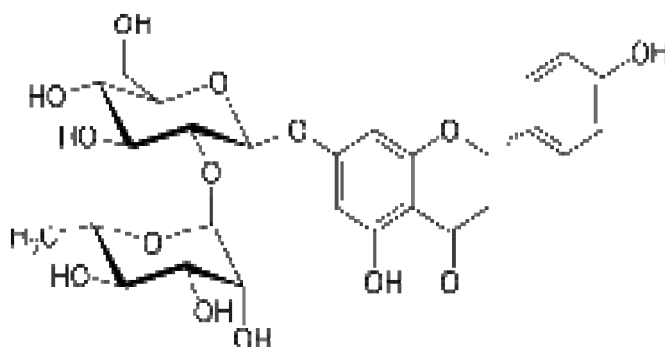
Στο πλαίσιο αξιοποίησης των φυσικών αντιοξειδωτικών Εσπεριδίνης (Σχήμα 1), Εσπεριτίνης (Σχήμα 2), Ναριγίνης (Σχήμα 3) και Ναργενίνης (Σχήμα 4) στην εκτροφή των αγροτικών ζώων για παραγωγή προϊόντων ποιότητας, αναπτύχθηκε μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού τους σε ιστό με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με υβριδικό φασματόμετρο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, συνδυασμού γραμμικής και τροχιακής παγίδας (LTQ-Orbitrap Discovery- Thermo Finnigan) εφοδιασμένο με πηγή ιονισμού ESI, σε αρνητικό ιονισμό.



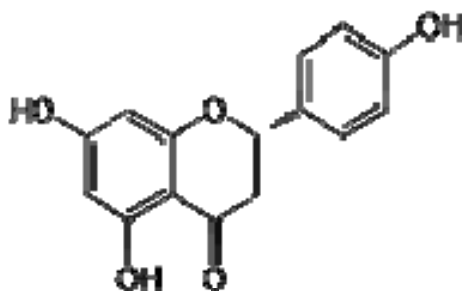
**Σχήμα 1.** Χημική δομή Εσπεριδίνης ( $C_{28}H_{34}O_{15}$ ) με Μοριακό Βάρος  $MW=610,56$  g/mol.



**Σχήμα 2.** Χημική δομή Εσπεριτίνης ( $C_{16}H_{14}O_6$ ) με Μοριακό Βάρος,  $MW=302,27$  g/mol.



**Σχήμα 3.** Χημική δομή Ναριγίνης ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ ) με Μοριακό Βάρος, MW=580,54 g/mol.



**Σχήμα 4.** Χημική δομή Ναργενίνη ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) με Μοριακό Βάρος, MW=272,257 g/mol.

Για την επικύρωση της μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκαν λυοφιλοποιημένα δείγματα ιστού από όρνιθες οι οποίες δεν είχαν καταναλώσει τροφές εμπλουτισμένες με τα τέσσερα μόρια (control samples).

### **Φύλαξη Δειγμάτων**

Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε καταψύκτες βαθιάς κατάψυξης ( $-85^{\circ}\text{C}$ ). Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, τα δείγματα ξεπάγωναν σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τη

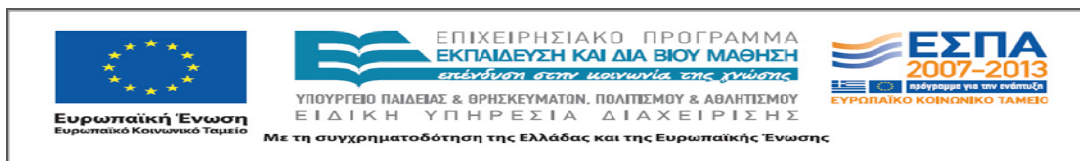
μεταφορά της απαιτούμενης ποσότητας σε φιαλίδια αποθήκευσης δειγμάτων (Errendorf tubes) μεταφέρονταν ξανά στους καταψύκτες βαθιάς κατάψυξης (-85°C).

### **Προετοιμασία Δειγμάτων**

Για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθοδολογίας κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς εύρους από 125 ng/gr ιστού έως 25 µg/gr ιστού τόσο με δείγματα προ-εκχυλίσεως (pre-spike calibration curve) όσο και με δείγματα μετα- της εκχυλίσεως (post-spike calibration curve). Παράλληλα, προετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας σε 4 επίπεδα (Quality Control Samples), επί 6 φορές σε κάθε επίπεδο.

**Α. Προετοιμασία Δειγμάτων προ- της Εκχυλίσεως (pre-spike):** Σε 0.020 gr ιστού όρνιθας προστέθηκαν 40 µl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό (1:1 v/v) σε εύρος συγκεντρώσεων από 125 ng/gr ιστού έως 25 µg/gr ιστού καθώς και 100 µl του εσωτερικού προτύπου 4-Ιωδοφαινόλης (2 µg/mL ). Ακολούθησε ομογενοποίηση με προσθήκη 200 ul διαλύματος Οξικού αμμωνίου οξικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-CH}_3\text{COOH}$ , pH=5), προσθήκη 1 mL ιστού χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών έγινε με την προσθήκη 1 mL παγωμένης ακετόνης και έντονη ανάδευση (vortex) ενώ ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Errendorf tube). Στο ίζημα προστέθηκε εκ νέου 200 µl παγωμένης ακετόνης (διπλή εκχύλιση) και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο ενώθηκε με αυτό της πρώτης εκχυλίσεως και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 200 µl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

**Γ. Προετοιμασία Δειγμάτων μετά- της Εκχυλίσεως (post-spike):** 0.020 gr ιστού όρνιθας ομογενοποιήθηκαν με την προσθήκη 200 ul διαλύματος Οξικού αμμωνίου



οξικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{pH}=5$ ). Στο ομογενοποιημένο διάλυμα έγινε προσθήκη 1 mL χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών έγινε με την προσθήκη 1 mL παγωμένης ακετόνης και έντονη ανάδευση (vortex) ενώ ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Errendorf tube). Στο ίζημα προστέθηκε εκ νέου 200 μl παγωμένης ακετόνης (διπλή εκχύλιση) και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρωση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο ενώθηκε με αυτό της πρώτης εκχυλίσεως όπου και προστέθηκαν 40 μl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό (1:1 v/v) σε εύρος συγκεντρώσεων από 125 ng/gr ιστού έως 25 μg/gr ιστού καθώς και 100 μl του εσωτερικού προτύπου 4-Ιωδοφαινόλης (2 μg/mL). Τα δείγματα εξατμίστηκαν ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρωση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 200 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

**Δ. Προετοιμασία Δειγμάτων Ελέγχου Ποιότητας (Quality Control Samples):** Σε 0.020 gr ιστού όρνιθας προστέθηκαν 40 μl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό (1:1 v/v) καθώς και 100 μl του εσωτερικού προτύπου 4-Ιωδοφαινόλης (2 μg/mL). Συνολικά προετοιμάστηκαν 6 επαναλήψεις για τις συγκεντρώσεις των 500 ng/gr ιστού (LQC), 2,5 μg/gr ιστού (MQC), 12,5 μg/gr ιστού (HQC) και 125 ng/gr ιστού (LLOQ). Ακολούθησε ομογενοποίηση με προσθήκη 200 μl διαλύματος Οξικού αμμωνίου οξικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{pH}=5$ ), προσθήκη 1 mL χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών έγινε με την προσθήκη 1 mL παγωμένης ακετόνης και έντονη ανάδευση (vortex) ενώ ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Errendorf tube). Στο ίζημα προστέθηκε εκ νέου 200 μl παγωμένης ακετόνης (διπλή εκχύλιση) και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) και

φυγοκέντρωση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο ενώθηκε με αυτό της πρώτης εκχυλίσεως και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρωση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχάνημα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 200 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

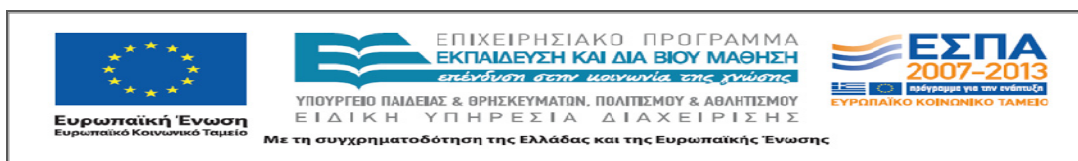
### Μεθοδολογία

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αρνητικό ιονισμό με τη χρήση συστήματος υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Accela-UHPLC) συζευγμένης με υβριδικό σύστημα γραμμικής και τροχιακής παγίδας σε σειρά (LTQ-ORBITRAP Velos), χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο μάζας Linear Ion Trap.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μορίων και τη λήψη των χρωματογραφημάτων ήταν η Ascentis Express HPLC Column C18 2.7μm με διαστάσεις 2.1 mm x 10 cm. Ο όγκος έγχυσης καθορίστηκε σε 10 μL, ενώ η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της γραμμικής παγίδας ιόντων (LTQ) σε διαχωριστική ικανότητα 30000. Ως μέθοδος σχηματισμού ιόντων χρησιμοποιήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός (electrospray). Οι παράμετροι λήψης των φασμάτων μάζας που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί:

Capillary Temp (C):	300.00
Source Heater Temp (C):	350.00
Sheath Gas Flow (l):	35.00
Aux Gas Flow (l):	30.00
Source Voltage (kV):	4.00
Front Lens (V):	6.25

Πίνακας 1. Παράμετροι λήψης φασμάτων μάζας.



Ως κινητή φάση επιλέχθηκε το σύστημα διαλυτών νερό-0.1% οξικό οξύ (ν/ν): ακετονιτρίλιο με βαθμιδωτή έκλουση. Το χρωματογραφικό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα 2 που ακολουθεί:

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flow Rate (μl/min)
0	95	5	0	300
0.10	80	20	0	300
1	80	20	0	300
1.10	70	30	0	300
3	70	30	0	300
3.10	50	50	0	300
5	50	50	0	300
5.30	0	0	100	300
5.70	0	0	100	300
5.80	95	5	0	300
12	95	5	0	300

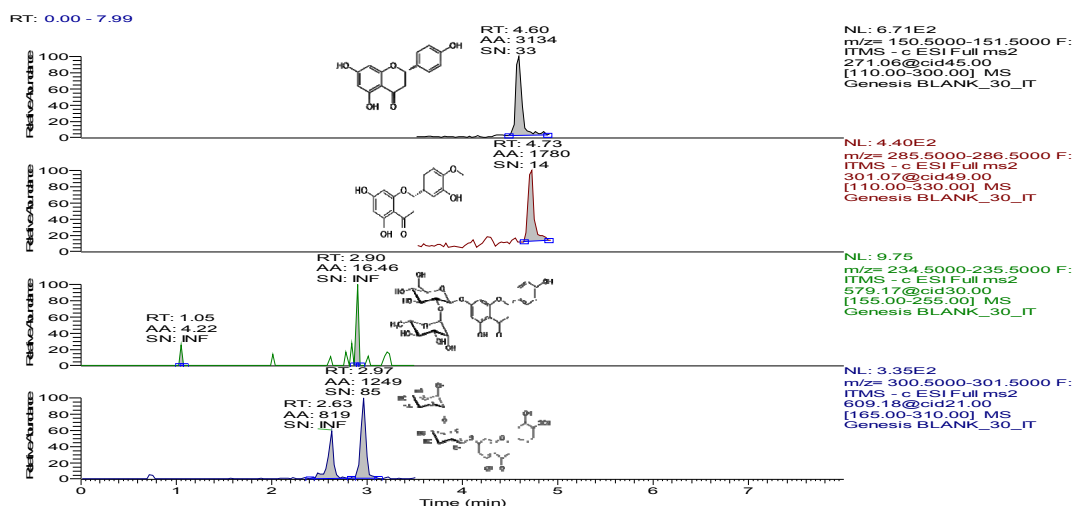
Πίνακας 2. Χρωματογραφικό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης των μορίων Εσπεριδίνης, Εσπεριτίνης, Ναριγίνης και Ναργενίνης.

όπου, A: H<sub>2</sub>O - 0.1% acetic acid (v/v)

B: Acetonitrile

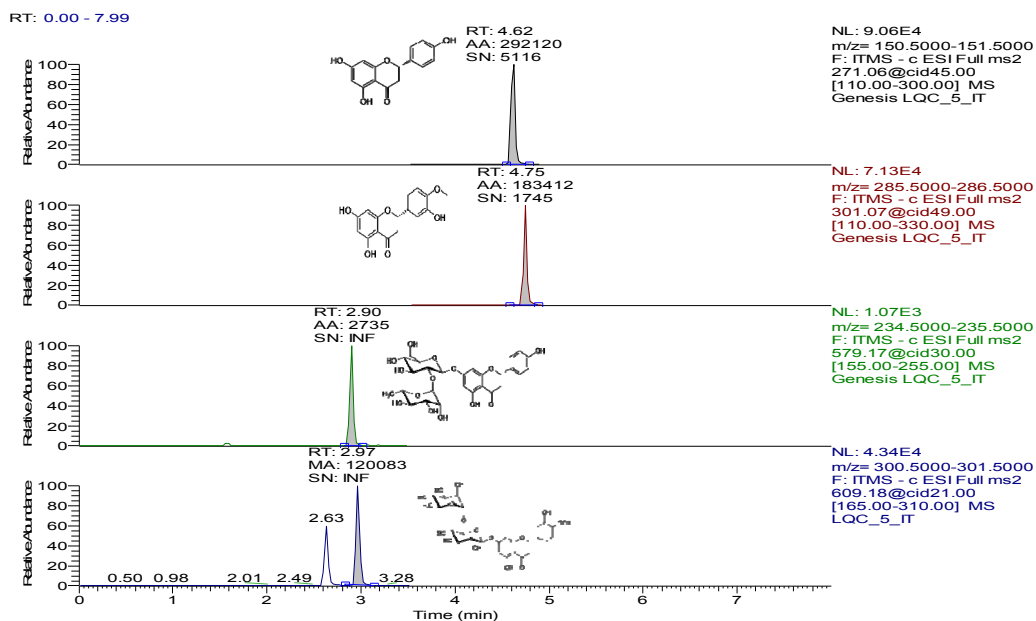
C: Ipro:ACN:Acetone 58:40:2 (v/v/v)

Ενδεικτικά, παρουσιάζονται 5 χρωματογραφήματα, ενός δείγματος blank (Σχήμα 1), ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας μικρής συγκέντρωσης (LQC) (Σχήμα 2), ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας μέσης συγκέντρωσης (MQC) (Σχήμα 3), ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας μεγάλης συγκέντρωσης (HQC) (Σχήμα 4) και ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας που αντιστοιχεί στο εγγυημένο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) (Σχήμα 5).

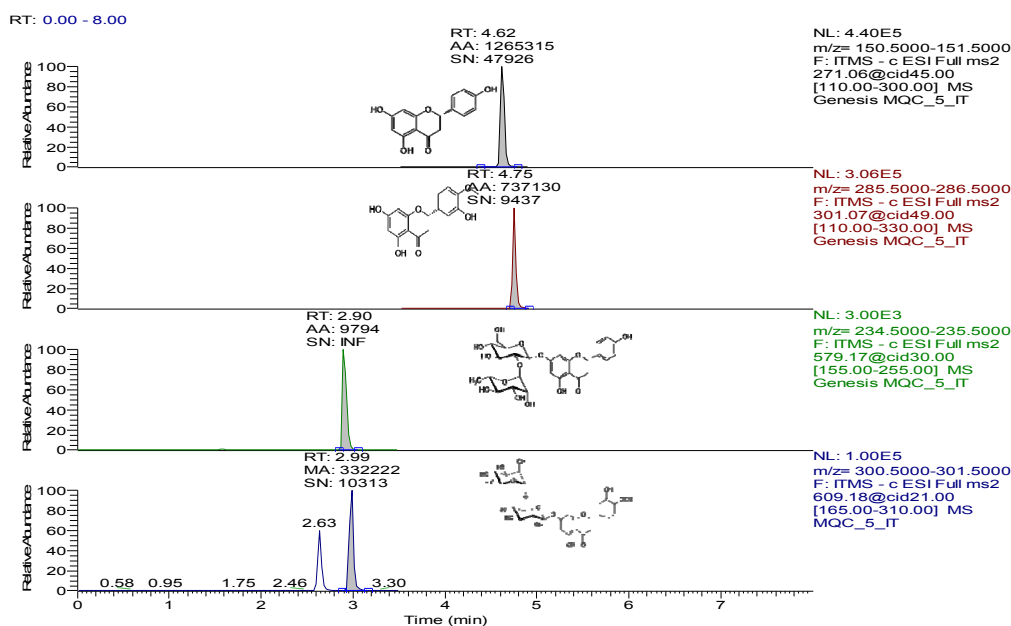


Σχήμα 1. Χρωματογράφημα δείγματος blank.

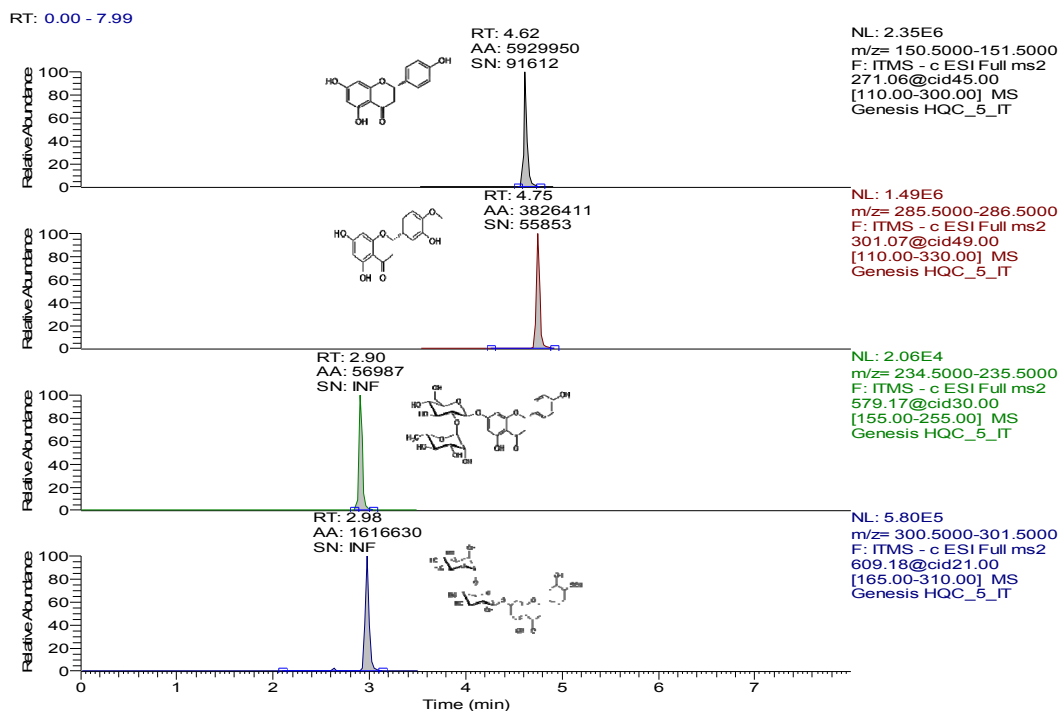




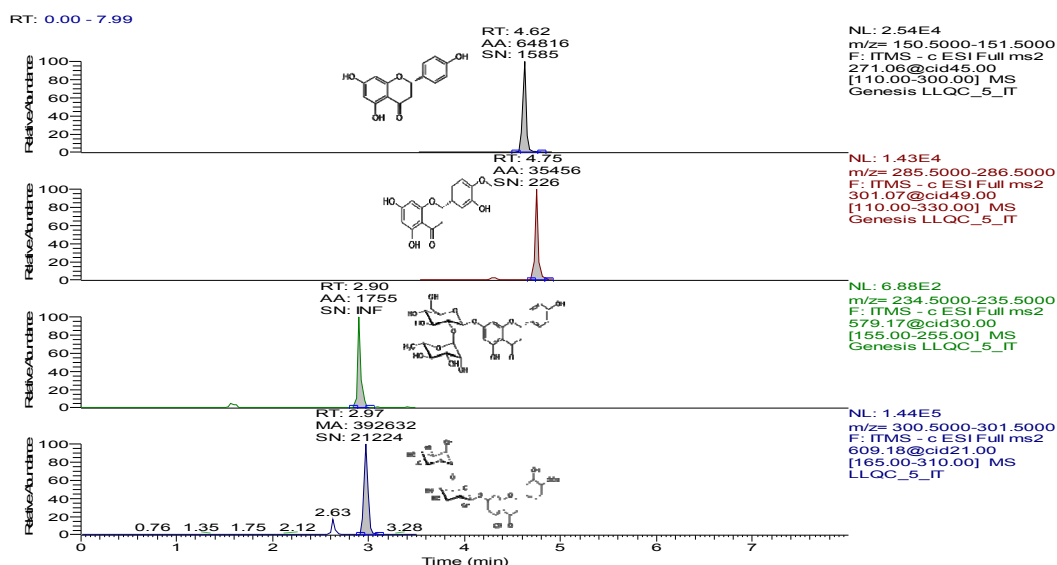
Σχήμα 2. Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας μικρής συγκέντρωσης (LQC).



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας μέσης συγκέντρωσης (MQC).



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας μεγάλης συγκέντρωσης (HQC).



**Σχήμα 5.** Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας που αντιστοιχεί στο εγγυημένο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ).

## Επικύρωση Μεθοδολογίας

Η επικύρωση της προτεινόμενης μεθοδολογίας περιλάμβανε την ανάλυση και επεξεργασία των κάτωθεν σταδίων:

- Επαναληψιμότητα
- Ακρίβεια
- Ποσοστό Ανάκτησης

**Επαναληψιμότητα:** Η επαναληψιμότητα μιας αναλυτικής μεθοδολογίας περιγράφει την διασπορά των επαναλαμβανόμενων ανεξάρτητων μετρήσεων ενός αναλύτη. Ο έλεγχος της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων ποιότητας

(Quality Control Samples) σε 4 επίπεδα (LLOQ, low, medium, high QC samples) επί 6 φορές σε κάθε επίπεδο (Πίνακας 3).

Μόρια	Lower Limit Of Quantitation Control (125 ng/gr ιστού )	Low Quality Control (500 ng/gr ιστού )	Medium Quality Control (2,5 µg/gr ιστού )	High Quality Control (12,5 µg/gr ιστού )
Hesperidin	16%	11.32%	10.35%	5.81%
Naringin	22.68%	12.95%	15.06%	4.99%
Hesperetin	4.85%	3.48%	6.88%	4.73%
Naringenin	13.78%	7.29%	2.61%	4.13%

**Πίνακας 3.** Ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) σε 4 επίπεδα (LLOQ, low, medium and high QC samples) εκφραζόμενα σε % RSD. Οι τιμές δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 15% για τα δείγματα ποιότητας, με εξαίρεση το LLOQ το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%.

**Ακρίβεια:** Η ακρίβεια αποτελεί βασική παράμετρο της ποιότητας της ανάλυσης και εκφράζεται ως το  $\%Error = \frac{[\text{θεωρητική συγκέντρωση} - \text{πειραματική συγκέντρωση}]}{\text{θεωρητική συγκέντρωση}} \times 100$ . Ο έλεγχος της ακρίβειας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) σε 4 επίπεδα (LLOQ, low, medium, high QC samples) επί 6 επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο (Πίνακας 4).

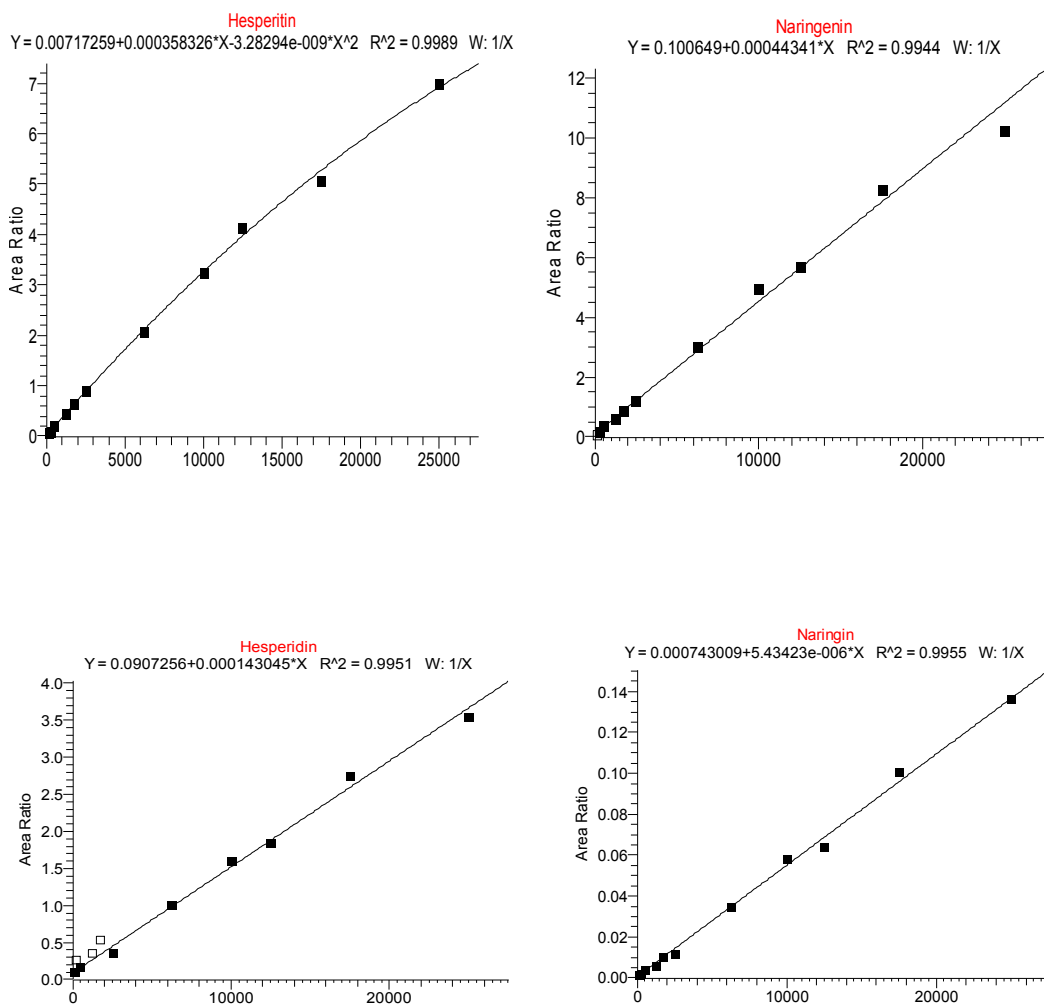
Μόρια	Lower Limit Of Quantitation Control (125 ng/gr ιστού )	Low Quality Control (500 ng/gr ιστού )	Medium Quality Control (2,5 µg/gr ιστού )	High Quality Control (12,5 µg/gr ιστού )
Hesperidin	11.78%	6.30%	4.09%	4.33%
Naringin	12.60%	12.21%	1.45%	2.09%
Hesperetin	1.45%	15.76%	13.87%	14.68%
Naringenin	14.32%	14.44%	14.50%	15.77%

**Πίνακας 4.** Ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) σε 4 επίπεδα (LLOQ, low, medium and high QC samples) εκφραζόμενα σε % RSD. Οι τιμές δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 15% για τα δείγματα ποιότητας, με εξαίρεση το LLOQ το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%.

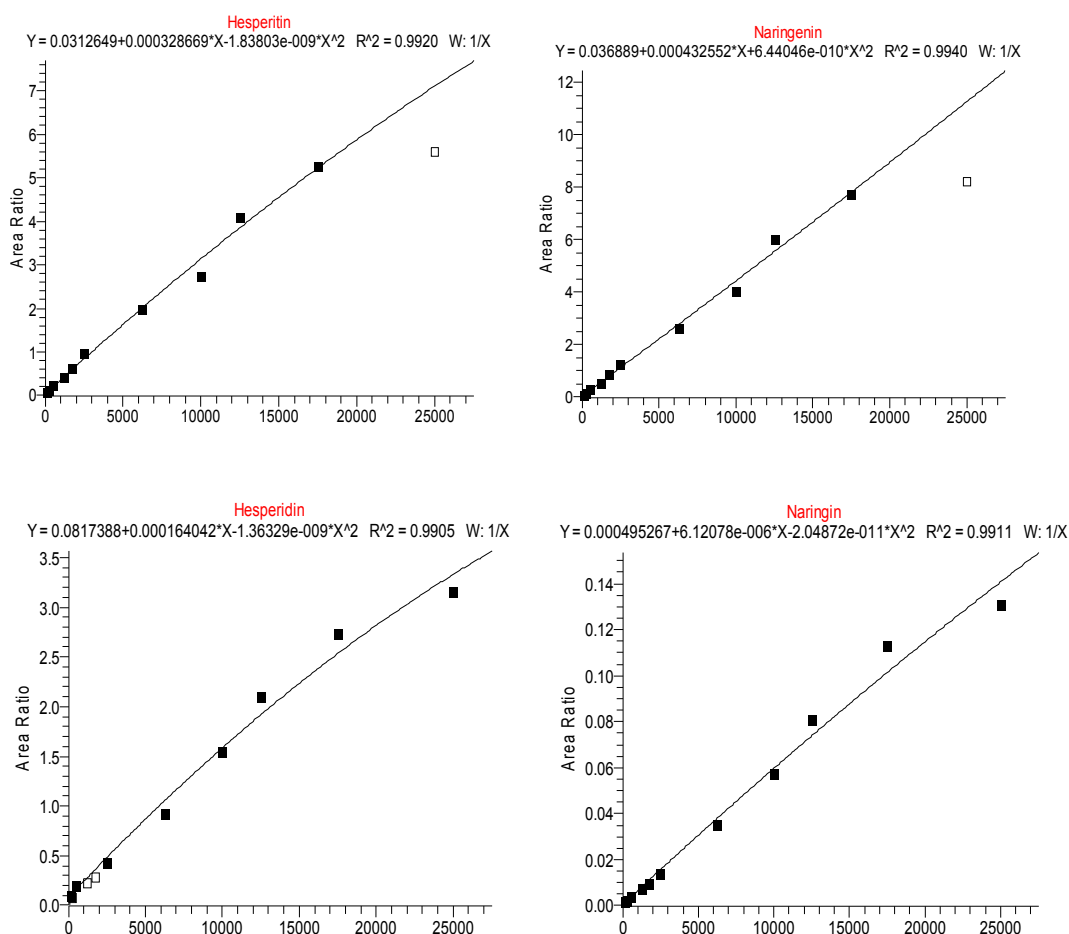
**Ποσοστό Ανάκτησης:** Για την εύρεση του ποσοστού ανάκτησης και των τεσσάρων μορίων, έγινε σύγκριση των καμπυλών αναφοράς δειγμάτων προ- της εκχυλίσσεως (pre-spike calibration curves) και μετα- της εκχυλίσσεως (post-spike calibration curves)  $\{R\% = (\text{slope pre-spike} / \text{slope post-spike}) \times 100\}$  (Πίνακας 5, Σχήμα 6, 7).

Μόρια	Ποσοστό Ανάκτησης (%)
Naringin	94.14
Hesperidin	105.24
Naringenin	99.31
Hesperetin	100.59

**Πίνακας 5.** Ποσοστό ανάκτησης των τεσσάρων μορίων ύστερα από σύγκριση των γραμμικών τμημάτων των καμπυλών αναφοράς δειγμάτων προ- της εκχυλίσσεως (pre-spike calibration curves) και μετα- της εκχυλίσσεως (post-spike calibration curves). Οι τιμές εκφράζονται ως  $R\% = (\text{slope pre-spike} / \text{slope post-spike}) \times 100$ .



**Σχήμα 6.** Καμπύλη αναφοράς δειγμάτων προ- της Εκχυλίσσεως (pre-spike) σε ιστό από όρνιθα μάρτυρα εύρους 125 ng/gr ιστού έως 25 μg/ gr ιστού για τα μόρια Ναργινίνη, Εσπεριδίνη, Ναργενίνη και Εσπεριτίνη.



**Σχήμα 7.** Καμπύλη αναφοράς δειγμάτων μετά- της Εκχυλίσεως (post-spike) σε ιστό από όρνια μάρτυρα εύρους 125 ng/gr ιστού έως 25 μg/ gr ιστού για τα μόρια Ναργινίνη, Εσπεριδίνη, Ναργενίνη και Εσπεριτίνη.

**Συμπέρασμα:** Η προτεινόμενη μεθοδολογία ποσοτικοποίησης των μορίων Εσπεριδίνης, Εσπεριτίνης, Ναργινίνης και Ναργενίνης σε δείγματα ιστού, παρουσιάζει υψηλή ανάκτηση, επαναληψιμότητα και ακρίβεια πιστοποιώντας την εγγύτητα στις



μετρήσεις ποσοτικοποίησης των τεσσάρων μορίων σε άγνωστα δείγματα ιστού από όρνιθες στις οποίες έχει χορηγηθεί τροφή εμπλουτισμένη με τα τέσσερα μόρια. Μελλοντικά, για την ολοκλήρωση της επικύρωσης της μεθοδολογίας θα μελετηθεί η επίδραση του υποστρώματος ενώ θα μελετηθεί και η επίδραση εξωτερικών παραγόντων στην ακρίβεια της μέτρησης.

#### Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής

Μ. Χαρισμιάδου

Π. Ζουμπουλάκης

Λέκτορας

Επίκουρος Καθηγήτρια

Ερευνητής